

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791962

研究課題名（和文）骨再生バイオマテリアルと間葉系幹細胞併用による骨再生向上の細胞学的解明

研究課題名（英文）Histological examination of bone regeneration induced by biomaterials mingled with mesenchymal stem cells

研究代表者

小島 拓 (KOJIMA TAKU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90515777

研究成果の概要（和文）：

近年、骨髄から分離した間葉系幹細胞を骨再生バイオマテリアルに播種するティッシュエンジニアリングを用いた骨再生が報告されている。しかし、骨再生の向上を組織学的に詳細に報告したものは少ない。本研究ではラット頭蓋骨に β -TCP ブロックを移植する動物実験モデルを用い、骨髄由来間葉系幹細胞から分化誘導した骨芽細胞様細胞を播種した場合（培養群）と、 β -TCP ブロック単独の場合（対照群）とを比較して新生骨を経時的に観察した。その結果、培養群では β -TCP ブロック辺縁部より中央に向かって経時的に新生骨が形成されていったが、対照群では β -TCP ブロック内に僅かに新生骨が形成されるのみであった。したがって、培養群では骨芽細胞様細胞群が優位に存在しているため対照群よりも骨再生が向上することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examined bone regeneration induced by our cell-delivery system, a porous beta-TCP block mingled with bone marrow stromal cells, in order to clarify histological events during the bone regeneration in this model. Bone marrow stromal cells obtained from the femora were induced into osteoblast-like cells, and then, seeded on a porous beta-TCP blocks. Beta-TCP blocks without the stromal cells were used as a control. The blocks were implanted in the rat calvariae and examined histologically. In the differentiated group, new bone was observed in the periphery of beta-TCP blocks, and then, it extended to the center of the beta-TCP blocks. In the control group, only a little new bone was observed in the bottom of the beta-TCP blocks. Thus, these results suggest that differentiated bone marrow stromal cells/beta-TCP composites have high osteogenic potential.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生、バイオマテリアル、間葉系幹細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、骨質

1. 研究開始当初の背景

骨再生バイオマテリアルには、従来、骨誘導能・骨伝導能を有している自家骨移植が主に用いられてきたが、骨採取手術が必要なため患者の侵襲が大きいという問題があった。一方、人工の骨補填材は骨採取手術の必要がなく使用量に制限が無いという利点があり、近年の骨再生治療に多く用いられている。人工材料には HA (ハイドロキシアパタイト)、 α -TCP、 β -TCP (リン酸三カルシウム) などが存在し、申請者はそれら種々の補填材に対する細胞動態と再生骨の骨質について報告してきた (Kojima et al; J Bone Miner. Metab. 2007, Kojima et al; BioMed. Res. 2007)。特に β -TCP については、破骨細胞の吸収が先行してから骨芽細胞による骨形成が生じることで緻密な再生骨が誘導されること、さらには、経時的に自家骨に置換されることが明らかとなり臨床における有用性が示された (研究代表者：小島 拓・平成 20-21 年度若手スタートアップ)。

一方、近年の再生医療において、組織幹細胞と細胞の足場となるバイオマテリアルを組み合わせることにより高次的な組織構築を可能とするティッシュエンジニアリングが注目を浴びている。骨再生においてもその技術導入が検討されており、骨髄から分離・培養した間葉系幹細胞を、生態親和性に優れたバイオマテリアルに組み込むことで培養骨をつくるのが提案されている (Pittenger et al; Science, 1999, Yoshikawa et al; J. Biomed. Mater. Res., 1996)。また、 β -TCP に間葉系幹細胞を播種した場合、 β -TCP 単独よりも効率的に骨再生が生じるとの報告もある (Ono et al; Jpn. J. Oral Maxillofac. Surg., 2007)。しかし、それらの再生技術によって骨再生の向上を組織学的に詳細に報告したものは非常に少ない。

そこで本研究では、骨再生バイオマテリアルに間葉系幹細胞を応用することで骨再生能の向上を目指し、その細胞組織学的解明を行う。

2. 研究の目的

本研究では、骨再生バイオマテリアルに間葉系幹細胞を応用した技術を駆使することで骨再生の向上を図り、各細胞イベント (骨芽細胞の分化誘導、破骨細胞と骨芽細胞のカップリング、骨細胞・骨細管系ネットワーク構築) および再生骨の骨質を微細構造学的・細胞学的に解明する。

具体的には、 β -TCP と間葉系幹細胞の応用法が、 β -TCP 単独と比較して、骨芽細胞への分化誘導・骨形成・骨質においてどれだ

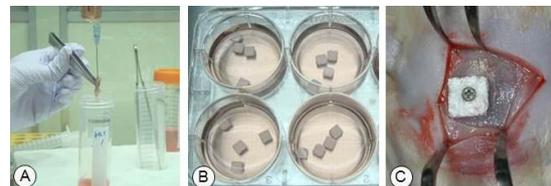
け向上性の高い再生骨を誘導できるかを評価する。その評価方法は、組織化学に加えて電子顕微鏡観察・元素分析法にまで及ぶ。

3. 研究の方法

(1) 動物：生後 4 週、12 週齢雄性 Fisher 系ラット

(2) 骨再生バイオマテリアル：多孔性 β -TCP ブロック (オスフェリオン®：オリンパステルモバイオマテリアル社)；気孔率 75%、大きさ 5×5×2 mm

(3) 実験術式：生後 4 週齢雄性 Fisher 系ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取して多孔性 β -TCP ブロック (オスフェリオン®) に播種し、 β グリセロリン酸、デキサメタゾン、アスコルビン酸を添加して骨芽細胞様細胞への分化を誘導しながら 3 週間培養を行った (図 A, B)。この骨髄細胞・ β -TCP ブロック複合体を、生後 12 週齢の同系ラット頭蓋骨骨膜下に移植したものを実験群とした。また、培養液に浸漬した β -TCP ブロックのみを移植したものを対照群とした (図 C)。一方で、培養細胞が骨芽細胞様細胞へ分化しているかを確認するため、アルカリフォスファターゼ、アリザリンレッドによる染色を行った。

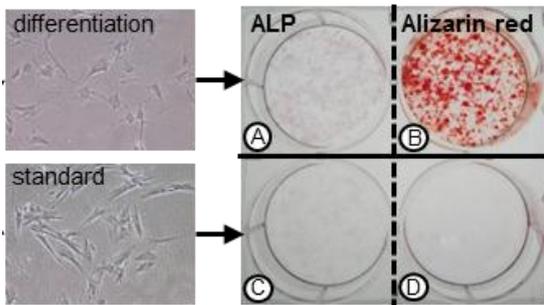


(4) 解析項目：術後 2, 4, 24 週目に灌流固定を行い、移植部位の骨新生について組織化学的、微細構造学的に以下の検討を行った。

- ① 組織化学：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP:破骨細胞の同定)、アルカリ性ホスファターゼ (ALP:骨芽細胞系細胞の同定)、
- ② 透過型電子顕微鏡解析
- ③ 電子線マイクロアナライザ (EPMA) を用いた元素マッピング (カルシウム、リン解析)

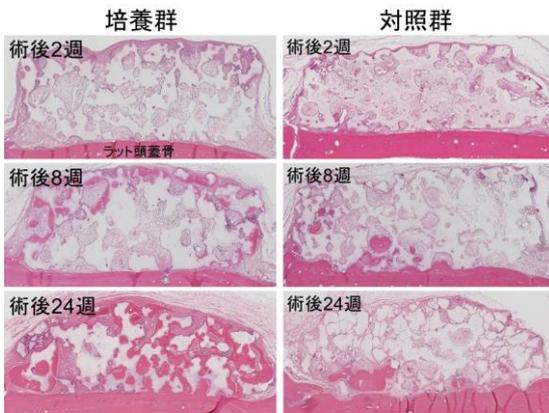
4. 研究成果

(1) 骨芽細胞様細胞への分化の評価

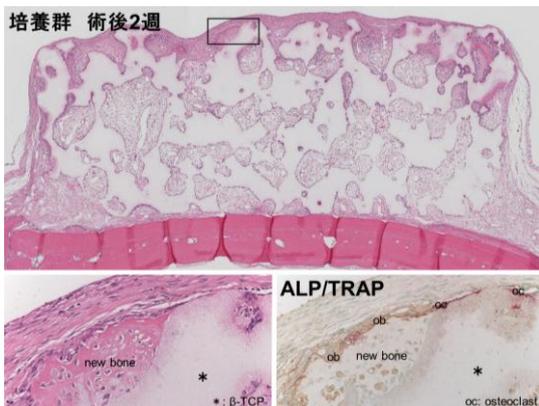


培養細胞が骨芽細胞様細胞へ分化しているかを確認するため、アルカリフォスファターゼ、アリザリンレッドによる染色を行ったところ、分化誘導した培養群ではいずれも陽性反応を認めた (A, B)。(C, D は基本培地)

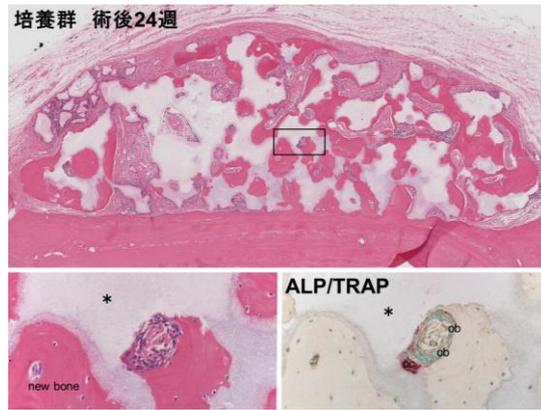
(2) 新生骨の組織化学的解析



培養群では β -TCPブロック辺縁部より中央に向かって経時的に新生骨が形成されるのに対し、対照群では β -TCPブロック底部にわずかに新生骨が形成されるのみである。

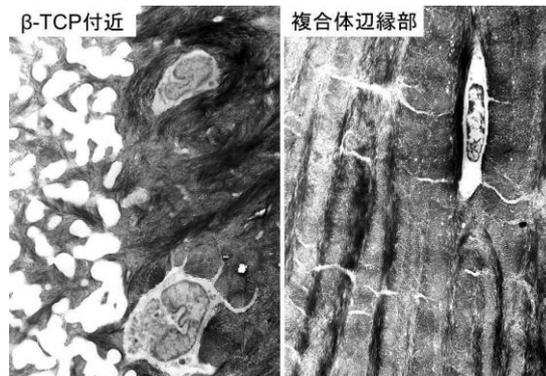


培養群術後 2 週では、複合体辺縁部に幼弱な線維性骨を認め、表層には多数の ALP 陽性骨芽細胞が配列している。一方、周囲の β -TCP 上には TRAP 陽性破骨細胞が局在している。



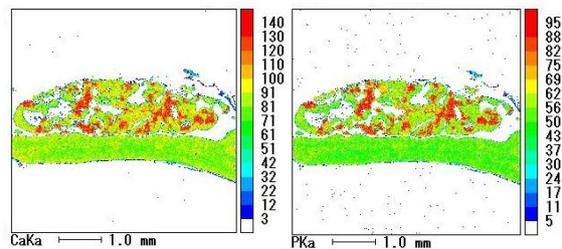
培養群術後 24 週ではブロック全域に新生骨を認め、その骨梁は太く層板様を呈する。またブロック中央部の β -TCP 上には TRAP 陽性破骨細胞が局在し、周囲に ALP 陽性骨芽細胞を認める。

(3) 新生骨の透過型電子顕微鏡観察



培養群術後 24 週では、 β -TCP 付近の新生骨はコラーゲン線維の走行が不規則で、内部の骨細胞の形態はふっくらとしている。一方、複合体辺縁部の新生骨では、コラーゲン線維が整然と密に配列し、骨細胞がコラーゲン線維の走行と平行に扁平となり、骨細管が伸び出している。

(4) 新生骨の元素マッピング



培養群術後 24 週において、EPMA による元素マッピングを行ったところ、新生骨は既存骨と同等のカルシウム、リン濃度を示す。

(5) まとめ

- ① 培養群における新生骨の形成は、 β -TCPブロック辺縁部から起こり、徐々に厚みを増していった。
- ② 新生骨表層には多数の骨芽細胞が配列し、周囲の β -TCP上には破骨細胞が局在しており、破骨細胞による β -TCPの吸収、骨芽細胞による新生骨形成といったカップリングのプロセスが示唆された。
- ③ 複合体辺縁部に形成された新生骨は、術後24週目にはブロック全域に形成された。
- ④ 術後24週目の新生骨は層板様を呈する緻密骨へと改変し、カルシウム、リン濃度は既存骨と同等の値を示した。したがって新生骨が、リモデリングにより良好な骨質を有する緻密骨へと改変されていくことが示唆された。
- ⑤ 対照群ではブロック底部にわずかな新生骨を認めるのみで、ブロック内部は線維性結合組織で占められていた。

(6) 結語

骨髄由来間葉系幹細胞を骨芽細胞様細胞に分化させ多孔性 β -TCPブロックに播種することで、 β -TCPブロック単体よりも広範囲に骨が新生されること、また骨芽細胞と破骨細胞のカップリングのプロセスを経て良好な骨質を有する骨再生が可能であることが示唆された。

したがって、骨再生バイオマテリアルに間葉系幹細胞を応用することで骨芽細胞様細胞群が優位に存在するため骨再生が向上することが組織学的に明らかとなった。

(7) 今後の展開

今回の動物実験モデルはラット頭蓋骨という比較的取扱いやすい部位を用いたが、今後のトランスレーショナルリサーチへの展開を考慮した場合、顎骨欠損動物モデルを用いた検討が必要である。さらに近年、間葉系幹細胞の採取部位として骨髄以外に脂肪、骨膜なども利用されている。間葉系幹細胞の採取が簡便で安全なものになれば患者への恩恵も大きい。間葉系幹細胞の由来の違いにより骨再生の向上にどれだけの影響があるのかについても解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① 小島 拓、芳澤享子、他：骨再生バイオマテリアルと間葉系幹細胞併用による骨再生向上の解析—培養技術を応用した新しい骨再生法の展開—。日本歯科医学会誌 31 巻、34-38 頁、2012。 査読有

② 小島 拓、芳澤享子、他：理想的なフォームとクオリティを有する骨再生への挑戦。日本歯科評論 70 巻 10 号、9-11 頁、2010。 査読無

[学会発表] (計3件)

① 小島 拓、芳澤享子、小野由起子、坂上直子、船山昭典、三上俊彦、齊藤力：骨髄細胞・多孔性 β -TCPブロック複合体による骨増生の評価。第15回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、幕張メッセ(千葉)、2011年12月3-4日、学術大会優秀発表理事長賞受賞

② Kojima T, Ono Y, Suzuki A, Sakagami N, Yoshizawa M, Hasegawa T, Amizuka N, Oda K, Maeda T, Saito C: Histological examination on bone regeneration induced by a porous beta-TCP block mingled with bone marrow stromal cells. International Bone-Tissue-Engineering Congress, Convention Center CC, Hannover, Germany, 12-15, Oct, 2011.

③ Kojima T, Amizuka N, Suzuki A, Yoshizawa M, Oda K, Maeda T, Saito C: Histological examination on bone augmentation with β -tricalcium phosphate and a thermoplastic bioresorbable plate. 20th Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Concertgebouw, Bruges, Belgium, 14-17, Sep, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 拓 (KOJIMA TAKU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：90515777